

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 4.236

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Nicole TRUFFAUT

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Etude de différents bactériophages de Bacillus subtilis
comportant de l'hydroxyméthyluracile dans leur DNA

Soutenue le 14 Avril 1970 devant la Commission d'Examen

MM. F. GROS Président

M. PASCAUD }
G. BERNARDI } Examineurs

M. P. MAY Membre invité

ARTICLE PRINCIPAL

Reconnaissance en partie

LA THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

M. le Président

M. le Secrétaire

Le Président de la Faculté des Sciences

Composition du Jury de la Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles
présentée par M. le Docteur en Sciences Naturelles
M. le Docteur en Sciences Naturelles

Commission d'Examen

Président

Examinateurs

Membre Invité

MM. E. ROS

M. PASCAUD

M. BERNARDI

M. MAY

Isolement et propriétés des chaînes du DNA de bactériophage 2 C

Nicole TRUFFAUT

Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif

(Reçu le 30 septembre/6 décembre 1969)

Bacillus subtilis phage 2 C DNA is double-stranded, with a high molecular weight (about 100 million), a low T_m (77.8°), and a high buoyant density (1.742 g/cm³) in a CsCl density gradient. Denatured DNA centrifuged in a CsCl gradient reveals two bands (1.752 and 1.762 g/cm³) corresponding to the complementary strands.

In this communication, we report preparative separation of two strands from denatured DNA, either by chromatography on a methylated albumin-kieselguhr column, or by density-gradient centrifugation in the presence of poly G. The melting curves of native and denatured DNA, and of isolated fractions before and after mixing and annealing, are compared. As shown by spectrophotometry, and by buoyant density, a good renaturation was obtained by mixing and annealing the "light" and "heavy" fractions; each isolated fraction cannot be renatured alone.

Poly G strongly binds to the heavy fraction, increasing its density in a CsCl gradient by about 48 mg/cm³; there is also some binding to the light fraction (density increase under the same conditions, 6 mg/cm³). The resulting density difference between the two fractions is more pronounced than the natural one: 52 mg/cm³ instead of 10 mg/cm³. Poly C only interacts with the light fraction and host ribosomal RNA with the heavy one.

Native DNA, and both fractions isolated by centrifugation in the presence of poly G, were analysed for base composition using ³²P-labelled DNA. Native DNA had a (G + C) content of 39.1%. As for the isolated fractions, there are more pyrimidines (cytosine, and hydroxymethyluracil replacing thymine) in the "heavier" fraction, which preferentially interacts with poly G.

Both strands from infectious DNA were assayed for infectivity with negative results. The "renatured" DNA also gave negative results, probably owing to some natural or accidental breakage.

Le bactériophage 2 C a été isolé de la terre par Pene et Marmur [1] en 1964; il est virulent pour la souche 168 transformable de *B. subtilis* et appartient, avec SP 8, à une famille de phages qui ont en commun certaines particularités de leur DNA: densité élevée en gradient de CsCl, température de fusion relativement basse, thymine remplacée par une base inhabituelle, l'hydroxyméthyluracile.

Le DNA de phage 2 C est à double chaîne, de poids moléculaire élevé, environ 100 millions, $s_w^\circ = 58$ [2]; il est infectieux. Centrifugé à l'équilibre en gradient de densité de chlorure de césium, il forme une seule bande étroite de densité apparente 1,742 g/cm³, anormalement élevée, et très différente de la densité du DNA de l'hôte *Bacillus subtilis* (1,7035 g/cm³). Le DNA dénaturé soit par la chaleur, soit par la soude, et centrifugé dans les mêmes conditions, se sépare en deux fractions de densité 1,752 et 1,762 g/cm³ qui doivent correspondre aux 2 chaînes

(Pene et Marmur [1]). Ces fractions respectivement « légère » et « lourde » sont accompagnées d'un « constituant intermédiaire » en plus ou moins grande quantité [3].

Cette caractéristique, due sans doute à une différence dans leur composition en bases, a l'intérêt de permettre la séparation préparative des chaînes. Pour plusieurs phages de *Bacillus*: phage α de *B. megatherium* [4], SP 8 et 2 C de *B. subtilis* [5,6,3], TP 84 de *B. stearothermophilus* [7], les deux chaînes du DNA ont été séparées par chromatographie sur colonne de Kieselguhr-albumine méthylée.

D'autre part, Opara-Kubinska et coll. [8,9], ont décrit un phénomène d'interaction préférentielle de l'une des deux fractions complémentaires de DNA dénaturé, avec des polyribonucléotides synthétiques (ou du RNA ribosomal); cette réaction spécifique serait due à la présence sur les chaînes de régions (*clusters*) à concentration élevée en base complémentaire du ribonucléotide lié; une telle réaction permet la séparation préparative des chaînes (Kubinski et coll. [9]) par dénaturation du DNA en présence de polyribonucléotide approprié, et centrifugation en gradient de densité de chlorure de césium.

Abbreviations et définitions. Solution Standard, 0,15 M NaCl—0,015 M citrate trisodique, pH 7,0; T_m , température de demi-dénaturation thermique du DNA; poly G et poly C, homopolymères des acides riboguanilyque et cytidylique; hmU, acide hydroxyméthyluridylique.



Sheldrick et Szybalski [10] ont montré que chez plusieurs phages de *Bacillus subtilis*, dont SP 82 (apparenté aux phages 2 C et SP 8), les *clusters* se trouvent rassemblés sur l'une des deux chaînes, celle qui servirait de modèle privilégié pour la transcription de RNA messenger dans le cas des phages SP 8 [5] *in vivo* et α [11] *in vitro*.

Le bactériophage 2 C et certaines propriétés physico-chimiques et biologiques de son DNA, ont été étudiés dans des articles précédents [3,12], ainsi que par May et coll. [2]. Dans le présent article nous montrons qu'après avoir obtenu une bonne séparation des deux fractions complémentaires du DNA de phage 2 C par une méthode reproductible, le mélange des deux fractions convenablement chauffé permet d'obtenir un DNA renaturé qui, selon différents critères, se montre proche de la molécule native; d'autre part, la fraction la plus lourde comporte, comme dans le cas des phages α [13] et SP 8 [5], une quantité plus importante de bases pyrimidiques, et se combine préférentiellement avec l'homopolymère de l'acide guanylique (poly G).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MILIEUX

Milieux de croissance. Milieu L: 10 g de tryptone (Difco); 10 g d'extrait de levure (Difco); 5 g de NaCl; 0,02 g de $MnCl_2$ pour 1 l d'eau bidistillée. Milieu L': milieu L + 10 mg/ml de gélatine (Difco).

Solvants. Solution standard: 0,15 M NaCl, 0,015 M citrate trisodique, pH 7,0; tampon phosphate selon Roscoe et Tucker [14] 7 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 5 g NaCl; 0,246 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,012 g $CaCl_2$; 0,010 g de gélatine (Difco) pour 1 l d'eau bidistillée.

Pour la transformation, les milieux CHT₅₀ et CHT₅ sont préparés selon les indications d'Anagnostopoulos et Spizizen [15].

SOUCHES BACTÉRIENNES

On utilise comme bactéries hôtes, les souches *B. subtilis* 168-2 (ind⁻) (leu⁻) [16], isolée à partir de la souche *B. subtilis* 168 (ind⁻) [17] et *B. subtilis* 168 A, (ind⁻) [2].

Pour étudier le pouvoir infectieux de DNA de phage 2 C on utilise la souche compétente *B. subtilis* 168 M (ind⁻). Le DNA de la souche prototrophe *B. subtilis* WT donnée par le Dr. C. Anagnostopoulos a servi aux contrôles de la compétence.

PRÉPARATION DU PHAGE

Le phage 2 C a été préparé à partir de lysats de *B. subtilis* souches 168-A et 168-2 dans le milieu L'; après purification par un cycle de centrifugation différentielle, le phage est repurifié éventuellement par centrifugation en gradient de chlorure de césium

(densité 1,50 g/cm³) dans le rotor SW 39 à l'ultra-centrifugeuse préparative Spinco, à 4° pendant 20 heures, à 30000 tours/min. Le phage forme une bande que l'on collecte en perçant le fond du tube pour recueillir les fractions; celles-ci sont ensuite rassemblées et dialysées contre la solution standard, ou le tampon phosphate.

PRÉPARATION DU DNA

Le DNA est préparé par extraction au phénol selon une modification de la méthode de Mandell et Hershey [18] décrite par May et coll. [2]. Pour certaines expériences le DNA est purifié par centrifugation en gradient de chlorure de césium de densité moyenne 1,75 g/cm³ avec une centrifugeuse Spinco L2 dans le rotor SW 39, pendant 48 heures à 8° et 35000 tours/min.

Préparation de DNA marqué au ³²P

La culture bactérienne fraîche est cultivée dans 400 ml de milieu L' contenant 5 μ C/ml de [³²P]phosphate de sodium, activité spécifique 2 mC/ml (C.E.A.). Le phage est ajouté à une multiplicité d'infection de 1-2 quand la concentration du bouillon bactérien est d'environ 5×10^7 bactéries/ml; il faut 2 à 3 heures pour que la lyse soit totale; la suite de la préparation du phage et l'extraction du DNA sont faites selon la technique décrite ci-dessus. L'activité spécifique du DNA obtenu est environ de 4000 coups/min/ μ g.

COURBE DE TEMPÉRATURE DE FUSION

La courbe de fusion du DNA (20 μ g/ml dans la solution standard) est tracée au spectrophotomètre Beckman DU équipé d'un compartiment chauffant et la température déterminée grâce à un thermocouple avec une précision de 0,2°.

DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASES PAR L'ANALYSE CHIMIQUE

On utilise 200 μ g de DNA marqué au ³²P, additionné de 2 mg de DNA froid, purifié, comme entraîneur: les DNAs précipités par l'isopropanol sont repris dans un tampon Tris 10 mM, $MgCl_2$ 15 mM, $CaCl_2$ 4 mM, pH 7,5 à la concentration de 2 mg/ml. 100 μ g/ml de DNase pancréatique (Sigma Chemical Co.) sont ajoutés, et la solution est incubée 1 heure à 37°. Puis le pH est amené à 8,6 et la molarité à 0,8 M avec un tampon glycine-NaOH-NaCl 3 M, pH 9,2 (0,3 ml pour 2 ml de solution) et l'hydrolyse en mononucléotides 5'-OH est complétée en incubant la solution 3 heures à 37°, avec 100 μ g/ml de phosphodiesterase de venin de serpent (Worthington); l'hydrolysate est plongé 5 min dans un bain-marie à 95° pour précipiter les protéines puis centrifugé; il

est ensuite chargé sur colonne (110 × 9 mm) de résine Dowex-1 X8 (200–400 mesh) sous forme de formiate. L'élution se fait selon la méthode de Canelakis et Mantsavinos [19] par une solution de formiate d'ammonium-acide formique pH 4,25, avec un double gradient de molarité linéaire de 0 à 0,3 M, puis de 0,3 à 0,8 M de formiate d'ammonium. Les fractions recueillies sont de 5 ml, l'absorption de chacune est mesurée à 260 nm et on trace éventuellement le spectre complet dans l'intervalle de longueurs d'onde de 230 à 320 nm pour déterminer la nature des mononucléotides obtenus.

La quantité de mononucléotides a été calculée en utilisant les coefficients d'extinction molaires suivants à pH 4,25: AMP ($\epsilon_{260} = 15300$), GMP ($\epsilon_{260} = 12800$), CMP ($\epsilon_{230} = 12400$), TMP ($\epsilon_{260} = 9130$), acide hydroxyméthyluridylique ($\epsilon_{260} = 9750$).

La radioactivité de chaque fraction est également mesurée au compteur à scintillation liquide Tricarb (Packard).

La composition en bases a été calculée à partir des données spectrophotométriques pour le DNA natif, et à partir des mesures de radioactivité pour le DNA natif et les fractions isolées.

FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE KIESELGUHR-ALBUMINE MÉTHYLÉE SELON SUEOKA ET CHENG [20]

Une technique dérivant de celle de Saunders [7] a été décrite précédemment [3]. Une variante de cette méthode a été utilisée ici permettant de mieux « décrocher » la 2^e fraction « lourde »: le DNA est dénaturé et chargé sur la colonne selon la technique déjà décrite; après élution d'une première fraction « légère » par une solution 0,85 M NaCl dans le tampon phosphate 0,05 M, pH 6,8, la totalité du DNA restant est éluée par une solution NaCl 1,7 M + NH₄OH 1 M dans l'eau distillée. Cette variante permet de recouvrer près de 100% du DNA mais la 2^e fraction est obtenue beaucoup moins pure que la 1^{re} ainsi que le montrent les résultats de centrifugation en gradient de densité de CsCl (Fig. 1), et toujours accompagnée d'un « constituant intermédiaire » dont nous avons déjà signalé la présence [3]. La 2^e fraction ainsi obtenue est ensuite chauffée 1 heure à 55° puis concentrée par évaporation et rechromatographiée. Remarque: l'utilisation d'une solution d'albumine méthylée « vieillie » (préparée 10 jours à l'avance) facilite sensiblement l'élution de l'une et l'autre fraction.

ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE EN GRADIENT DE DENSITÉ DE CHLORURE DE CÉSIMUM

La solution de CsCl de densité 1,76 g/cm³ contient en moyenne 3 µg de l'échantillon de DNA à analyser, et 2 µg d'un DNA marqueur (DNA de *Micrococcus lysodeikticus* de densité apparente 1,731 g/

cm³) dans 0,8 ml de solution standard, elle est centrifugée 18 h à 44770 tours/min à 25°, dans une ultracentrifugeuse analytique Spinco, modèle E; à partir des photographies prises à l'équilibre, les graphiques sont tracés avec un microdensitomètre Joyce-Loebl.

Séparation des fractions selon la technique de fixation avec des polyribonucléotides

Nous avons utilisé du poly G donné généreusement par le Dr. Michelson, et par la suite, du poly G (Miles lab.) préparé en solution aqueuse 1 mg/ml et conservé à -20°; le chlorure de césium est un produit Harshaw; les centrifugations analytiques ou préparatives en présence de poly G, poly C ou RNA ont été faites selon la technique de Kubinski et coll. [9].

Ultracentrifugation analytique

Une préparation de DNA (10 µg/ml) dans la solution standard est chauffée 6 min à 100° en présence d'acide polyriboguanilylique (poly G) (5 µg/ml) et refroidie rapidement; du CsCl est ajouté jusqu'à obtenir une densité de 1,76 g/cm³ dans un volume de 2 ml et on centrifuge 0,8 ml de la solution dans une centrifugeuse analytique Spinco modèle E, pendant 18 à 20 heures à 44770 tours/min à 25°.

Centrifugation préparative

La solution contient: 100 à 200 µg de DNA, 50 à 100 µg de poly G dans 3 ml de la solution standard diluée 5 fois. Le DNA est ajouté à la solution de poly G portée à 100°, celle-ci est gardée encore 6 min à 100°, puis refroidie rapidement et versée dans du CsCl dans la solution standard diluée 5 fois, de densité finale 1,76 g/cm³ et de volume final 5 ml; la solution est centrifugée dans des tubes en nitrate de cellulose pendant 38 heures à 33000 tours/min, à 15° à la centrifugeuse Spinco L dans le rotor SW 39: des fractions de deux gouttes sont recueillies en perçant le fond du tube, leur densité est déterminée par réfractométrie, on mesure l'absorbance à 260 nm de chaque fraction, et sa radioactivité; les fractions formant un pic sont rassemblées et débarrassées du poly G, soit par incubation pendant 4 heures à 37° dans KOH 0,3 N, soit selon le procédé de Summers et Szybalski [21] par chauffage 2 min à 95° dans la solution de CsCl, (ce qui déplace le poly G de son association avec le DNA) et refroidissement du complexe en présence de poly C 2 µg/ml; celui-ci se lie au poly G et le complexe poly C — poly G, quand il ne gêne pas la poursuite de l'expérience, est laissé dans la solution; sinon, il est retiré par une nouvelle centrifugation préparative, dans les mêmes conditions que précédemment. Coefficient d'extinction: nous avons admis pour le DNA natif un coefficient d'extinction $E_{260} = 0,020 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$.

ÉTUDE DE L'INFECTIVITÉ DES CHAÎNES ISOLÉES

La technique suivie est celle d'Anagnostopoulos et Spizizen [15] avec les modalités décrites dans l'article de May et coll. [2]. Les milieux de croissance et de transformation, les souches bactériennes utilisées sont ceux décrits dans ce dernier article.

RÉSULTATS

Nous savons déjà que le DNA dénaturé soit par la chaleur (10 min à 100°) soit par la soude (pH amené à 12,5 pendant 2 min puis neutralisation) et centrifugé dans un gradient de densité de CsCl se sépare en 2 bandes de densités 1,752 et 1,762 g/cm³ qui correspondent aux chaînes respectivement «légère» et «lourde». Elles disparaissent lorsque le DNA dénaturé est incubé dans des conditions favorisant la renaturation et font place à une seule bande étroite dont la densité se rapproche progressivement de celle du DNA natif (1,745 g/cm³ en moyenne après 30 min à 55°).

Séparation préparative des chaînes sur colonne de kieselguhr-albumine méthylée

Les fractions recueillies correspondent à 2 pics d'absorption à 260 nm; elles sont rassemblées, dialysées contre la solution standard et centrifugées en gradient analytique de CsCl. Elles ont pour densités respectivement: 1,752 g/cm³ pour le premier pic (correspondant à la fraction «légère») et 1,762 g/cm³ pour le 2^e pic (accompagné du «constituant intermédiaire» 1,756 g/cm³) correspondant à la fraction «lourde».

La Fig. 1 montre les densités en gradient de CsCl, correspondant: (A) au DNA natif, (B) au DNA dénaturé 10' à 100° dans la solution standard, (E) et (G) respectivement aux fractions légère et lourde isolées par chromatographie. La 2^e fraction (lourde) se détache plus difficilement, elle est obtenue moins pure, presque toujours accompagnée du constituant intermédiaire; celui-ci représente sans doute une portion du DNA non dénaturé, ou dans une première phase de renaturation, (C) représente le DNA renaturé par chauffage 30 min à 55° (précédé d'une dialyse contre la solution standard pour le DNA dénaturé par la soude). La densité obtenue se rapproche de la densité du DNA natif pour atteindre une valeur de 1,744 à 1,746 g/cm³; la légère différence qui existe entre les densités apparentes du DNA natif et renaturé est explicable par des imperfections dans l'appariement des bases.

Le mélange équimoléculaire des 2 fractions, chauffé dans les mêmes conditions de renaturation que le DNA dénaturé dont les chaînes n'ont pas été isolées, donne également une seule bande de densité 1,744—1,746 g/cm³ (Fig. 1 D).

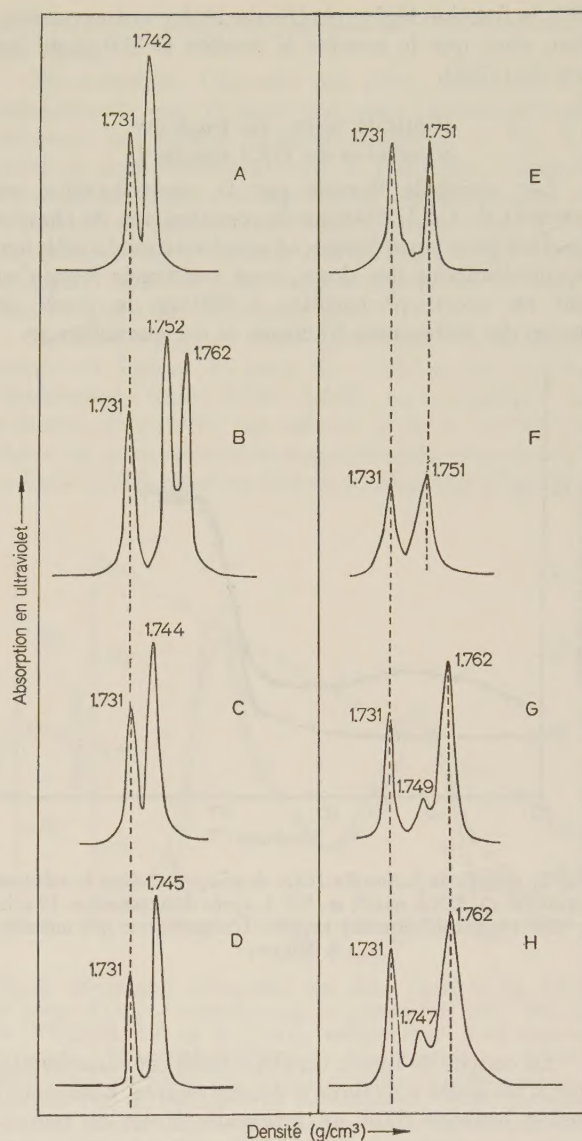


Fig. 1. Densités en gradient de chlorure de césium du DNA de phage 2 C. (A) natif; (B) dénaturé 10 min à 100°; (C) renaturé par chauffage 30 min à 55°; (E) chaîne légère; (F) la même après chauffage 30 min à 55°; (G) chaîne lourde accompagnée du constituant intermédiaire; (H) la même après chauffage 30 min à 55°. DNA de référence (*M. lysodeikticus*) = 1,731 g/cm³

Les Fig. 1 F et H représentent respectivement la première fraction (voir E) et la deuxième (voir G) chauffées dans les mêmes conditions, mais séparément. Dans les 2 cas, il n'y a aucune renaturation propre à chacune des fractions. Seul le constituant intermédiaire se renature, ce qui est en faveur d'une structure à double chaîne de ce constituant. Cependant, après un chauffage très prolongé (18 heures à

60°), la fraction légère révèle une légère autorenaturation, ainsi que le montre la densité (1,750 g/cm³ au lieu de 1,752).

Profil de fusion des fractions séparées et du DNA renaturé

Les résultats fournis par la centrifugation en gradient de CsCl: absence de renaturation de chaque fraction prise séparément, et renaturation du mélange équimoléculaire des deux, sont confirmés lorsqu'on suit au spectrophotomètre à 260 nm le profil de fusion des différentes fractions et de leur mélange.

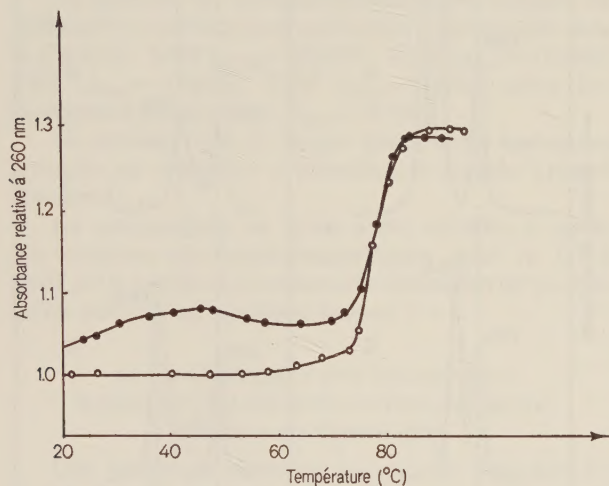


Fig. 2. Courbe de fusion du DNA de phage 2 C dans la solution standard. O, DNA natif; ●, DNA après dénaturation 10 min à 100° et refroidissement rapide. L'absorbance est mesurée à 260 nm

La courbe de fusion du DNA natif est caractéristique d'un acide nucléique à double chaîne, homogène: fusion brusque dans un intervalle étroit de température, avec une forte hyperchromicité (39% sans correction de volume). La température de fusion (T_m) est $77,8 \pm 0,2^\circ$ dans la solution standard (Fig. 2). Ceci est conforme aux résultats de Pene et Marmur [1].

Chacune des 2 fractions par contre montre une courbe de fusion caractéristique de chaînes simples repliées au hasard, avec une augmentation de densité optique plus précoce et plus lente, suivie d'un palier entre 50° et 70°, et d'une petite hyperchromicité résiduelle de 5 à 15% vers le T_m , probablement due à un appariement non spécifique des bases à l'intérieur d'une même chaîne (Fig. 3).

Le mélange des 2 fractions (Fig. 3) a un profil de fusion très différent de celui de chacune d'elle prise séparément. Il est semblable à celui que l'on observe dans le cas du DNA dénaturé au préalable par la soude pH 12,5, 2 min, ou par la chaleur 10° à

100° (Fig. 2B): la densité optique augmente progressivement puis décroît de 40° à 65°: la renaturation commence avec le réappariement spécifique des 2 régions complémentaires. Enfin, au-delà de 70°, la courbe est superposable à celle d'un DNA natif, le T_m est à peu près le même (77,7°) seule l'hyperchromicité reste plus faible que dans le cas du DNA natif (20% au lieu de 39%) (Fig. 3).

Ces courbes de fusion sont très semblables à celles qu'ont obtenues Marmur et Cordes [13] pour le phage α , et Saunders et Cambell pour le phage TP 84 [7].

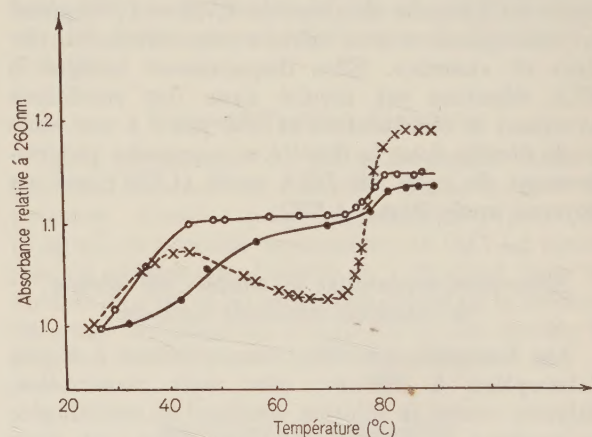


Fig. 3. Courbe de fusion des fractions. ●, Fraction lourde; O, fraction légère, x, mélange équimoléculaire des deux; l'absorbance est mesurée à 260 nm, dans la solution standard

Séparation des chaînes à l'aide de polyribonucléotides

Les fractions complémentaires du DNA isolées par chromatographie présentent un certain degré de contamination de l'une par l'autre variable selon les préparations; la pureté de la 2^e fraction est peu satisfaisante, ceci est dû à la présence déjà mentionnée du constituant intermédiaire (Fig. 1G).

Nous avons obtenu une bonne séparation par la méthode de Kubinski et coll. [9]: dénaturation par la chaleur en présence de polyribonucléotide (poly G), qui se lie de préférence avec les groupes «riches en désoxycytidylate» existant sur l'une des 2 chaînes ou les deux, suivie d'une centrifugation en gradient de densité de CsCl:

Centrifugation analytique. Les résultats obtenus avec le DNA de phage 2 C sont les suivants: la densité du DNA natif n'est pas changée en présence de poly G (comparer la Fig. 4A à la Fig. 1A). Le poly G se fixe sur les deux fractions du DNA dénaturé, mais surtout sur la plus lourde, augmentant la différence de densité apparente entre les deux, dans

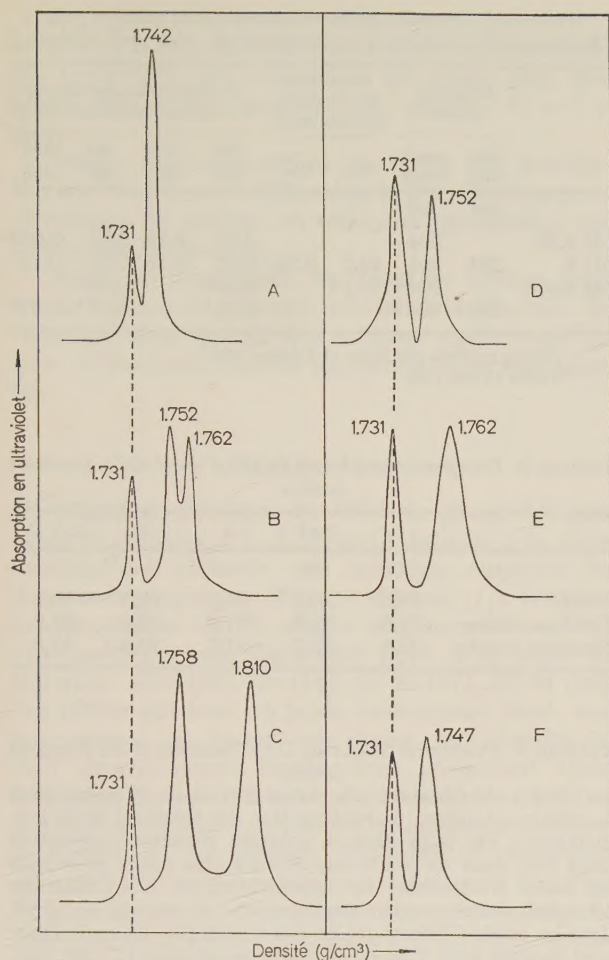


Fig. 4. Centrifugation du DNA en gradient de densité de CsCl, en présence de poly G. (A) DNA natif + poly G; (B) DNA seul dénaturé 10 min à 100°; (C) même traitement en présence de poly G, le rapport poly G/DNA (poids/poids) = 1/2; (D) fraction légère, le poly G a été ôté par incubation dans KOH; (E) fraction lourde, même traitement; (F) mélange de (D) et de (E), 30 min de chauffage à 55°.

Densité du DNA de référence = 1,731 g/cm³

un gradient de CsCl; la densité de la fraction légère passe de 1,752 à 1,758 g/cm³ en moyenne (différence de densité 6 mg/cm³) et la fraction lourde de 1,762 à 1,810 g/cm³ en moyenne (augmentation de 48 mg/cm³). C'est ce que fait ressortir la comparaison entre les Fig. 4C et 4B.

Séparation préparative. La séparation se fait aisément par centrifugation préparative à condition de ne pas utiliser une trop grande quantité de DNA (100 à 150 µg). La Fig. 5 montre une expérience d'isolement des chaînes: les fractions indiquées sur la figure sont rassemblées en deux pics correspondant aux deux chaînes lourde et légère; la pureté est bonne et une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions de chaque ensemble de fractions fait

apparaître un seul pic apparemment non contaminé par l'autre.

Renaturation. Chacune des deux fractions, débarrassée du poly G ainsi que nous l'avons indiqué, retrouve sa densité normale (Fig. 4D et E). Un mélange équimoléculaire des 2 fractions, renaturé dans les conditions mentionnées précédemment et centrifugé en gradient de CsCl, ne montre plus qu'un seul pic de densité variable entre 1,746 et 1,748 g/cm³ (Fig. 4F); la densité des deux fractions après chauffage 30 min à 55° ne change pas.

Action du poly C. Pour débarrasser les fractions lourde et légère du poly G, nous avons préféré l'incubation dans KOH 0,3 N, au chauffage en présence de poly C, car celui-ci se lie à la fraction légère, en provoquant une augmentation de sa densité en CsCl: 1,756 g/cm³ au lieu de 1,752 g/cm³ (Fig. 6B);

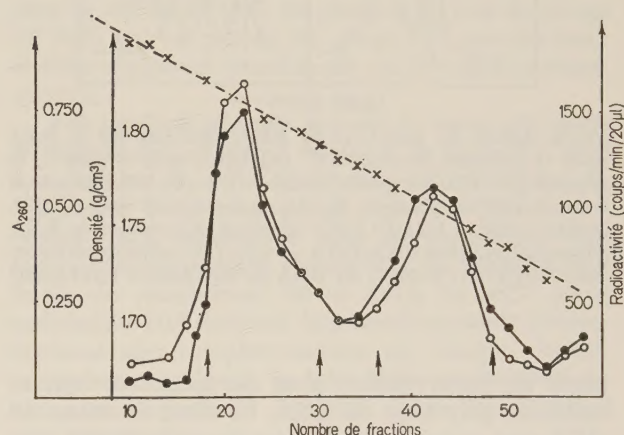


Fig. 5. Séparation préparative des deux fractions du DNA de phage 2 C, par centrifugation en gradient de CsCl. 200 µg de [³²P]DNA, 100 µg de poly G, volume final: 5 ml, densité moyenne 1,760 g/cm³, fractions de deux gouttes: x, densité déterminée par réfractométrie; O, absorbance à 260 nm après dilution 1/6; ●, radioactivité en coups/min 20 µl; les fractions se trouvant entre deux flèches sur la figure sont rassemblées en deux pics et dialysées contre la solution standard

le poly C n'a aucun effet sur la densité de la chaîne lourde (Fig. 6B) ou du DNA natif (Fig. 6A).

Action du RNA ribosomal. Le RNA ribosomal, extrait des ribosomes de *B. subtilis* selon la méthode de Nirenberg et Matthaei [22] se lie également avec la fraction lourde. Riva et coll. [23] ont utilisé cette technique pour séparer les chaînes du DNA d'un autre phage de *B. subtilis*: SPP 1. Dans le cas du phage 2 C, la séparation des deux chaînes du DNA de cette façon est possible; elle présente un avantage: la fraction légère ne se lie pas avec le RNA ribosomal dans les conditions de notre expérience (Fig. 6C), sa densité reste égale à 1,752 même en présence d'une quantité importante de RNA [rapport RNA/DNA (poids/poids) = 1]. Cependant, cette méthode com-

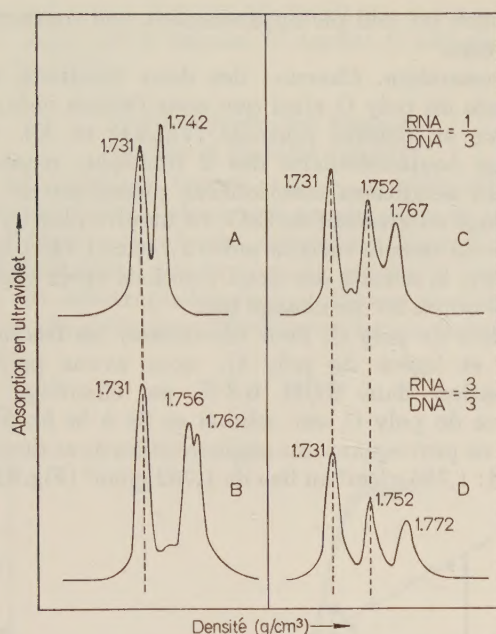


Fig. 6. Action du poly C et du RNA ribosomal sur le DNA natif et dénaturé de phage 2 C. (A) DNA natif + poly C, le rapport poly C/DNA (poids/poids) = 1/2; (B) DNA dénaturé 6 min à 100° en présence de poly C, le rapport poly C/DNA (poids/poids) = 1/2; (C) DNA dénaturé en présence de RNA ribosomal (rapport RNA/DNA = 1/3); (D) même expérience, RNA/DNA = 1. Densité du DNA de référence = 1,731 g/cm³

porte un inconvénient: pour des quantités équivalentes de poly G et de RNA, les deux fractions du DNA sont moins bien séparées dans ce dernier cas; la densité de la fraction lourde varie de 1,762 à 1,772 g/cm³ pour un rapport RNA/DNA (poids/poids) = 1 (Fig. 6D); la différence de densité entre les deux fractions atteint 0,020 g/cm³, au lieu de 0,052 g/cm³ environ quand on utilise le poly G, et on ne peut ajouter une quantité plus importante de RNA: l'absorption excessive de la solution en ultraviolet gêne alors la lecture des tracés.

Analyse des bases. La concordance des résultats obtenus par les techniques précédentes appuie l'hypothèse qu'il s'agit bien de chaînes complémentaires du DNA, séparées: chacune d'elles n'est pas susceptible de renaturation seule, mais uniquement en présence de la fraction complémentaire; on attend de l'analyse des bases une vérification de cette hypothèse. Par l'analyse chimique, nous obtenons les résultats suivants: la thymidine est remplacée dans le DNA de phage 2 C par l'hydroxyméthyluracile (hmU), ce qui confirme les déductions de Pene et Marmur [1]. Le Tableau 1 représente les caractéristiques spectrophotométriques du nucléotide dhmU 5'-monophosphate obtenu après dégradation successive par la DNase pancréatique et la phosphodiesterase de venin de serpent; les valeurs

Tableau 1. Données spectrophotométriques relevées pour l'hydroxyméthyluridine 5'-monophosphate, aux pH 4,25 et 2

Longueur d'onde	mini-mum	maxi-mum	Coefficients d'extinction millimolaires		Rapports des absorbances à différentes longueurs d'onde			
			ϵ_{max}	ϵ_{260}	250/260	275/260	280/260	290/260
	nm	nm						
pH 4,25		264			0,69	0,76	0,51	0,095
pH 2	234	264	10,2	9,75	0,72	0,75	0,52	0,12
pH acide		264 ^a	10,2 ^a		0,69 ^a		0,56 ^a	
	234 ^b	264 ^b			0,70 ^b		0,57 ^b	0,57 ^b

^a Valeurs publiées par Kuno et Lehman [24].

^b Kallen et coll. [26].

Tableau 2. Composition en bases du DNA natif et des fractions isolées

	C	hmU	A	G	G + C
	%	%	%	%	%
Natif	19,6	30,3	30,5	19,5	39,1
Fraction légère	17,8	28,9	31,4	22,0	39,8
Fraction lourde	23,1	32,5	27,7	16,8	39,9

Tableau 3. Pouvoir infectant du DNA dénaturé et des fractions isolées

Le DNA a été dénaturé à la concentration de 50 µg/ml dans la solution standard, la renaturation des fractions et de leur mélange a été faite dans la solution standard concentrée deux fois, dans les conditions décrites plus haut; pour tous les essais d'infectivité la concentration en DNA était de 10 µg/ml, concentration pratiquement saturante en DNA dans les essais d'infectivité du DNA natif [2]: 10 µg de DNA sont incubés avec 1 ml de cellules compétentes [2×10^8 bactéries/ml, de *B. subtilis* 168 M (ind⁻) pendant 30 min]

DNA de phage 2 C	Pourcentage d'activité par rapport au natif
	%
Natif	100
Dénaturé, 10 min, 100°	0,01
Renaturé	< 10 ⁻⁴
Dénaturé, pH 12,5, 2 min	0,08
Renaturé	< 10 ⁻⁴
Fraction légère	< 10 ⁻⁴
Fraction lourde	< 10 ⁻⁴
Mélange fractions lourde et légère, et chauffage	< 10 ⁻⁴

correspondent *grosso modo* à celles données par Kuno [24].

Le Tableau 2 montre la composition en bases du DNA natif et des fractions isolées; la composition a été calculée à partir de données spectrophotométriques pour le DNA natif, et à partir des mesures de radioactivité pour le DNA natif et les fractions séparées. Il y a une bonne concordance des résultats fournis par les mesures de radioactivité (DNA marqué au ³²P), et les mesures spectrophotométriques.

Le DNA natif comporte un pourcentage de G + C = $39,1 \pm 0,4\%$; par une méthode de fractionnement des nucléotides sur colonne de gel d'agar [25]. Bernardi trouve un résultat très proche: G + C = 39% .

Enfin, les compositions en bases des fractions légère et lourde sont différentes, la première comporte davantage de purines, et moins de pyrimidines que la seconde (Tableau 2).

Etude de l'infectivité des fractions isolées. Nous avons mesuré le pouvoir infectant de chacune des fractions, ainsi que de leur mélange après renaturation; le Tableau 3 montre les résultats qui sont négatifs.

DISCUSSION

L'analyse chimique du DNA de phage 2 C confirme la présence d'hydroxyméthyluracile à la place de thymine, présence que laissaient supposer les données biophysiques (Pene et Marmur [1]). D'autres bactériophages de *B. subtilis* contiennent de l'hydroxyméthyluracile dans leur DNA à la place de thymine: SP 8 [26], Φ_e [14], SP 82 [27], SP 01 [28]. Ces DNAs ont tous un poids moléculaire élevé, une température de fusion très basse, une densité en CsCl anormalement élevée, tous présentent après dénaturation, une distribution « bimodale » dans un gradient de chlorure de césium, et leurs compositions en bases sont très voisines. En outre, ils présentent une réaction immuno-chimique commune: en effet, l'immunisation de lapins avec des préparations de DNA dénaturé de bactériophage 2 C induit la formation d'anticorps réagissant contre ce DNA (May-Levin et coll. [12]), ou contre les DNAs des phages SP 8, Φ_e , SP 82 et SP 01 (May-Levin, communication personnelle) mais ces anticorps ne donnent aucune réaction croisée avec des DNAs dépourvus d'hydroxyméthyluracile (DNA de *B. subtilis*, de *Clostridium perfringens*, de *Micrococcus lysodeikticus*, de phage SP 50, de thymus de veau). Les déterminants antigéniques communs aux DNAs à hydroxyméthyluracile sont constitutifs de chacune des chaînes de la molécule et révélés par dénaturation thermique ou alcaline.

Pour les fractions isolées, la proportion d'adénosine et d'hydroxyméthyluracile diffère de ce que l'on a trouvé pour le DNA natif; par comparaison avec celui-ci, la chaîne légère comporte davantage de guanine ($22,0\%$) et d'adénine ($31,4\%$), et moins de cytosine ($17,8\%$), et de hydroxyméthyluracile ($28,9\%$). Cette proportion est inversée pour la fraction lourde, qui est plus riche en bases pyrimidiques (cytosine et hydroxyméthyluracile). C'est également cette dernière qui se lie préférentiellement avec le poly G.

L'interprétation de Kubinski [9]: présence de groupes riches en cytidine sur une chaîne, auxquels

se lierait l'homopolymère de l'acide guanylique, peut expliquer cette liaison préférentielle de la fraction lourde avec le poly G.

Dans le cas du DNA de phage 2 C ces régions riches en désoxycytidine existeraient également sur la chaîne légère, puisque celle-ci se lie aussi au poly G, mais dans une moindre mesure.

Un rôle éventuel de ces groupes riches en désoxycytidine dans la transcription a été suggéré par Szybalski, Kubinski et Sheldrick [29]: pour ces auteurs, les régions riches en pyrimidines qui existent dans les différents DNAs étudiés, sont en relation avec les régions d'initiation de la transcription du RNA messenger. Dans le cas particulier du phage 2 C, il serait intéressant de savoir comment se comportent les deux chaînes: sont-elles capables de transcrire le RNA messenger alternativement, comme les deux chaînes du DNA de phage λ [30], ou bien, comme dans le cas de T7 [21], du phage α [11] ou du phage SP 8 [5] qui est proche du phage 2 C, une des deux chaînes seulement jouerait-elle un rôle dans la transcription?

Les résultats négatifs obtenus au cours des essais de transfection du DNA renaturé de phage 2 C sont à rapprocher de la faible efficacité de transfection du DNA natif de ce même phage ($1,5 \times 10^5$ équivalents-phages sont nécessaires pour la formation d'un centre infectieux (May et coll. [2])). La fragilité aux forces de cisaillement de ce DNA de haut poids moléculaire (10^8 daltons), la présence possible d'interruptions non complémentaires sur chaque chaîne, pourraient expliquer la très faible probabilité de restaurer l'infectivité du DNA après dénaturation puis renaturation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pene, J. J., et Marmur, J., *Fed. Proc.* 23 (1964) 318.
2. May, P., May, E., Granboulan, P., Granboulan, N., et Marmur, J., *Ann. Inst. Pasteur*, 115 (1968) 1029.
3. May, P., Truffaut, N., et Revet, B., *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)*, 262 (1966) 2780.
4. Cordes, S., Epstein, H. T., et Marmur, J., *Fed. Proc.* 21 (1962) 375.
5. Marmur, J., Greenspan, C. M., Palecek, E., Kahan, F. M., Levine, J., et Mandel, M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28 (1963) 191.
6. Oda, K., et Marmur, J., *Biochemistry*, 5 (1966) 761.
7. Saunders, G. F., et Campbell, L. L., *Biochemistry*, 4 (1965) 2836.
8. Opara-Kubinska, Z., Kubinski, H., et Szybalski, W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52 (1964) 923.
9. Kubinski, H., Opara-Kubinska, Z., et Szybalski, W., *J. Mol. Biol.* 20 (1966) 313.
10. Sheldrick, P., et Szybalski, W., *Fed. Proc.* 25 (1966) 207, et *J. Mol. Biol.* 29 (1967) 217.
11. Tocchini-Valentini, G. P., Stodolsky, M., Aurisicchio, A., Sarnat, M., Graziosi, F., Weiss, S. B., et Geiduschek, E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 50 (1963) 935.
12. May-Levin, F., Truffaut, N., Lacour, F., et May, P., *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* 265 (1967) 937.

13. Marmur, J., et Cordes, S., *Informat. Macromol.* (edited by H. J. Vogel, V. Bryson, and J. D. Lampen), Acad. Press, New York 1963, p. 19.
14. Roscoe, D. H., et Tucker, R. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1964) 106.
15. Anagnostopoulos, C., et Spizizen, J., *J. Bacteriol.* 81 (1961) 741.
16. Romig, W. R., *Virology*, 16 (1962) 452.
17. Spizizen, J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 44 (1958) 1072.
18. Mandell, J. D., et Hershey, A. D., *Anal. Biochem.* 1 (1960) 66.
19. Canellakis, E. S., et Mantsavinos, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 643.
20. Sueoka, N., et Cheng, T. Y., *J. Mol. Biol.* 4 (1963) 161.
21. Summers, W. C., et Szybalski, W., *Virology*, 34 (1968) 9.
22. Nirenberg, M. W., et Matthaei, J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 47 (1961) 1958.
23. Riva, S., Polsinelli, M., et Falaschi, A., *J. Mol. Biol.* 35 (1968) 347.
24. Kuno, S., et Lehman, I. R., *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1266.
25. Bernardi, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 155 (1968) 21.
26. Kallen, R. G., Simon, M., et Marmur, J., *J. Mol. Biol.* 5 (1962) 248.
27. Green, D. M., *J. Mol. Biol.* 10 (1964) 438.
28. Okubo, S., Strauss, B., et Stodolsky, M., *Virology*, 24 (1964) 552.
29. Szybalski, W., Kubinski, H., et Sheldrick, P., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31 (1966) 123.
30. Taylor, K., Hradecna, Z., et Szybalski, W., *Fed. Proc.* 26 (1967) 449, et *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 57 (1967) 1618.

N. Truffaut
Service de Biophysique
Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer
Boîte postale 8, F-94 Villejuif, France

